

(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 847 755 A1

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:

17.06.1998 Patentblatt 1998/25

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: A61K 35/78

(21) Anmeldenummer: 97121030.7

(22) Anmeldetag: 29.11.1997

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC  
NL PT SE

Benannte Erstreckungsstaaten:

AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 14.12.1996 DE 19652183

(71) Anmelder:

SCHAPER & BRÜMMER GMBH & CO. KG  
D-38259 Salzgitter (DE)

(72) Erfinder:

- Nesselhut, Thomas Dr.  
37075 Göttingen (DE)

• Bodinet, Cornelia

38259 Salzgitter (DE)

• Schnelder, Peter Dr.

38259 Salzgitter (DE)

• Freudenstein, Johannes Dr.

38640 Goslar (DE)

(74) Vertreter:

Lins, Edgar, Dipl.-Phys. Dr.Jur. et al

GRAMM, LINS &amp; PARTNER

Theodor-Heuss-Strasse 1

38122 Braunschweig (DE)

(54) Verwendung eines Extraktes aus *Cimicifuga racemosa*

(57) Die Wirkung eines standardmäßig zur Behandlung östrogenabhängiger Tumore eingesetzten anti-östrogenen Wirkstoffs wird potenziert durch die gleichzeitige Gabe eines Extraktes aus *Cimicifuga racemosa*, vorzugsweise in Dosierungen zwischen 5 mg und 500 mg Droge pro Tag.

EP 0 847 755 A1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Extraktes aus *Cimicifuga racemosa* zur Behandlung östrogenabhängiger Tumore.

Extrakte aus dem Wurzelstock der Traubensilberkerze (*Cimicifugae racemosae rhizoma*) weisen östrogenähnliche Effekte auf. In den Extrakten sind Komponenten gefunden worden, die spezifisch an Östrogenrezeptoren binden und bei ovariectomierten Ratten die Gonadotropinspiegel senken können. Die Verabreichung dieser Extrakte zur Behandlung klimakterischer Beschwerden und Dysmenorrhö hat sich daher bewährt.

Für Mammakarzinom-Risikopatienten verbietet sich die Anwendung von östrogenhaltigen Arzneimitteln zur Regulierung von klimakterischen Beschwerden, da die Ausbreitung von östrogenabhängigen Tumoren naturgemäß durch Östrogengaben verstärkt wird. Da der Mechanismus der Wirkungsweise für die östrogenanalogen Substanzen noch unklar ist, ist vorsorglich für die Verabreichung dieser Substanzen ein Risiko für östrogenabhängige Tumore als Kontraindikation angesehen worden.

Es ist zwar bereits berichtet worden (Nesselhut et al. in TW Gynokologie (1993) Seiten 249 bis 250), daß die Phytopharmaka Rhaponticin und *Cimicifuga*-Extrakt in niedrigeren Konzentrationen die Proliferation von Karzinomzellen *in vitro* verstärken, in höheren Konzentrationen hingegen möglicherweise hemmen.

Eine Verifizierung dieser Ergebnisse ist nicht publiziert worden, so daß das Verbot der Verabreichung von Phytopharmaka mit östrogen-analoger Wirkung für Risikopatienten bezüglich östrogenabhängiger Tumore weiterhin besteht.

Es ist bekannt, östrogenabhängige Tumore mit einem antiöstrogenen Wirkstoff zu therapieren. Der gängigste Wirkstoff dieser Art ist derzeit Tamoxifen (Z)-2-[4-(1,2-Diphenyl-1-Butenyl) Phenoxy]-N,N-Dimethylethylamin).

Für die Patienten, die mit einem derartigen Antiöstrogen behandelt wurden, kam aus den oben erwähnten Gründen eine Regulierung der klimakterischen Beschwerden durch Östrogene oder östrogen-analoge Substanzen nicht in Betracht.

Eine Hemmung der Proliferation von Mammatumorzellen ist abhängig von der Konzentration des Tamoxifens. Der Erhöhung der Konzentration in einen Bereich hinein, wo die Proliferation der Tumorzellen sicher verhindert wird, ist jedoch nicht möglich, da Tamoxifen in diesen Konzentrationen toxisch wird.

Die vorliegende Erfindung geht daher von der Problemstellung aus, eine Tumorthherapie auch mit niedrigeren Antiöstrogen-Konzentrationen zu ermöglichen.

Erfindungsgemäß wird hierzu in Kombination mit dem Antiöstrogenen Wirkstoff ein Extrakt aus *Cimicifuga racemosa* verwendet.

Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß

der Extrakt aus *Cimicifuga racemosa* die Proliferation von östrogenabhängigen Tumorzellen nicht nur nicht verstärkt sondern in Kombination mit einem antiöstrogenen Wirkstoff dessen proliferationshemmende Wirkung deutlich verstärkt, so daß auch eine vollständige Proliferationshemmung erreichbar ist, ohne in den Bereich der Toxizitätsgrenze für den antiöstrogenen Wirkstoff geraten zu müssen.

Die Potenzierung der Wirkung eines antiöstrogenen Wirkstoffes ist anhand des Standard-Wirkstoffes Tamoxifen genauer untersucht worden. Andere Experimente geben Hinweise darauf, daß auch die antiöstrogene Wirkung von Genistein durch einen Extrakt aus *Cimicifuga racemosa* verstärkt wird. Bevorzugte Verdünnungen des Extraktes liegen im Bereich zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-5}$ , da Verdünnungen bis  $10^{-2}$  *in vitro* toxische Effekte hervorbringen. Bevorzugte Dosierungen liegen zwischen etwa 5 mg und 500 mg Droge pro Tag.

Die erfindungsgemäße Wirkung des *Cimicifuga*-Extraktes auf die Proliferation von östrogenabhängigen Karzinomzellen, insbesondere Mammakarzinomzellen, ist *in vitro* mit einem Testsystem aus MCF-7 Zellen erfolgt.

Die MCF-7 Zelllinie ist ein etabliertes *in vitro* Modell für östrogenabhängige Tumore, die sowohl Östrogenrezeptoren als auch Aromataseaktivität besitzen. Die menschliche Brustkrebslinie wurde abgeleitet von einer Pleuraeffusion bei einem metastasierenden Brusttumor und besitzt signifikante Mengen an  $17\beta$  Rezeptoren (Schwarte, A. (1994) Wirkspektrum ausgewählter Flavonoide auf die humane Brustkrebslinie MCF-7: Eine *in vitro* Studie. Witten-Herdecke, Universität, Bereich Medizin, Diss. 1994).

Der Einfluß von *Cimicifuga*-Extrakt auf die Proliferation der MCF-7 Zellen wurde anhand des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin bestimmt.

## Material und Methoden

### Testsubstanzen

$17\beta$ -Estradiol (Sigma) und Tamoxifencitrat (Sigma) wurden 1-M in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und in einer 1:10 Verdünnungsreihe in Zellkulturmedium entsprechend weiter verdünnt. *Cimicifuga*-Extrakt wurde in einer 1:10 Verdünnungsreihe direkt mit Zellkulturmedium verdünnt.

### Herstellung des *Cimicifuga racemosa*-Extraktes

Nach Prüfung auf Identität, Reinheit und Gehalt wurden 30 kg der zerkleinerten Arzneidroge *Cimicifuga racemosa rhizoma* für 10 Tage mit 50 l Isopropylalkohol 40 % (V/V) mazeriert. Der Extrakt wurde abgelassen und die Droge abgepreßt. Die vereinigten Fraktionen wurden mit Isopropylalkohol 40 % (V/V) auf ein Endvolumen von 35 l aufgefüllt.

### Proliferationsassay MCF-7

MCF-7 Zellen wurden von der ATCC (HTB 22) bezogen und in Eagle's MEM (Eagle's Minimal-Essential-Medium) mit nicht-essentiellen Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 10 µg/ml Insulin und 10 % FKS (Foetales Kälberserum) kultiviert.

Vor Einsatz in den Test wurden die MCF-7 Zellen mindestens eine Passage in Eagle's MEM ohne Phenolrot mit nicht-essentiellen Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 10 µg/ml Insulin und 5 % FKS (Foetales Kälberserum) gehalten. Um östrogenfreie Wachstumsbedingungen im Test zu erhalten, wurde für den Testansatz das Insulin aus dem Zellkulturmedium entfernt und das FKS durch 5 % "Charcoal stripped" FKS (CSF) ersetzt.

200 µl einer auf  $5 \times 10^4$  c/ml eingestellten Zellsuspension wurden pro Vertiefung in 96er Mikrotiterplatten (Nunc) pipettiert und 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Überstände vorsichtig abgenommen und 150 µl frisches Zellkulturmedium pro Vertiefung pipettiert.

Die Testsubstanzen wurden gelöst, in Zellkulturmedium verdünnt und in 4 Parallelen a 50 µl/Vertiefung pipettiert. Als Kontrollen wurden Zellkulturmedium sowie die entsprechenden Lösungsmittelverdünnungen jeweils mitinkubiert.

Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen mit 25 µl/Napf (6-<sup>3</sup>H)-Thymidin (Amersham, spez. Aktivität 2 Ci/mMol) für 8 h gepulst. Danach wurden sie nach Standardmethoden (Cell Harvester Inotech) auf Glasfaserfilter geerntet und in einem Flüssig-Szintillations-Counter (Wallac) gezählt. Die Ergebnisse wurden als cpm = "counts per minute" ausgedruckt.

### Herstellung des "Charcoal-Stripped" FKS (CSF)

1 Tablette "Dextran coated charcoal tablets" (Steranti Separe<sup>®</sup>) wurde in 10 ml FKS aufgelöst. Danach wurde das Serum 2x45 min im Wasserbad bei 56 °C inaktiviert und im Anschluß bei 3000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und über einen Filter mit Porengröße 0,2 µm filtriert.

### Toxizitätsassay

Zur Bestimmung der Toxizität der einzelnen Prüfsubstanzen wurde ein Fluoreszenzassay mit Hela Suspensionszellen durchgeführt.

Hela-Zellen wurden auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  c/ml Medium (Eagle's MEM + 5 % FKS) eingestellt und 100 µl der Suspension in 96er Mikrotiterplatten (Nunc) pipettiert. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe der Testsubstanzen in Medium angelegt und von jeder Verdünnung jeweils 100 µl pro Vertiefung in 4 Parallelen pipettiert. Die Ansätze wurden 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Danach wurden die Mikrotiterplatten bei 800 rpm zentrifugiert und die Überstände vorsichtig abgenommen. 200 µl einer Lösung aus 0,1 mg/ml 4-Methylumbelliferylheptanoat in PBS wurden pro Vertiefung pipettiert. Nach 60 min wurden die Fluoreszenzeinheiten pro Vertiefung in einem Mikrotiterplattenfluorimeter (Fluoroskan II) bestimmt.

### Ergebnisse

Zu Beginn der Untersuchungen wurde zunächst das Testsystem auf seine Sensitivität überprüft. Als Positivkontrolle wurde 17-β Östradiol in Dosierungen von  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  bzw.  $10^{-9}$ -Molar getestet.

In allen drei getesteten Dosierungen induzierte 17-β Östradiol eine Steigerung der Proliferation von MCF-7 Zellen um 80-100 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, wie aus Figur 1 ersichtlich ist.

Parallel wurde in jedem Testansatz eine Lösungsmittelkontrolle durchgeführt. DMSO bewirkte in der maximal im Test eingesetzten Konzentration kein signifikante Proliferationssteigerung oder -hemmung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

In einem weiteren Ansatz wurde der Einfluß des nicht-steroidalen Antiöstrogens Tamoxifen auf das Testsystem geprüft.

Tamoxifen bewirkte in den Dosierungen  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$ -Molar eine 100%ige bzw. 77%ige Hemmung der Proliferation, in Dosierungen von  $10^{-6}$  dagegen eine Steigerung der Einbauraten um 52 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die antiproliferative Wirkung von Tamoxifen zeigte sich auch, wenn Tamoxifen zusammen mit einer konstanten Dosis an Östradiol appliziert wurde. Die östrogeninduzierte Proliferationssteigerung konnte dosisabhängig durch Tamoxifen inhibiert werden.

Die Ergebnisse dieser Vorversuche machten deutlich, daß das MCF-7 Testsystem geeignet ist, sowohl östrogene als auch antiöstrogene Wirkungen von Testsubstanzen nachzuweisen.

Um dies zu kontrollieren, wurden in den folgenden Versuchsserien neben Mediumkontrollen und Lösungsmittelkontrollen (Negativkontrollen) jeweils eine Positivkontrolle für östrogene Wirkung, bestehend aus 17-β Östradiol in einer Dosierung von  $10^{-7}$  oder  $10^{-8}$ -Molar und eine Positivkontrolle für antiöstrogene Wirkung, bestehend aus Tamoxifen in einer Dosierung von  $10^{-5}$ -Molar, mitgeführt.

Bevor der Cimicifuga-Extrakt in das MCF-7 System eingesetzt wurde, wurde dessen Toxizität zunächst in einem Toxizitätsassay mit Hela-Zellen überprüft.

Bis zu einer Verdünnung von  $10^{-2}$  zeigte der Extrakt auf dieser Zelllinie toxische Effekte. Ab einer Verdünnung von  $10^{-3}$  waren keine Unterschiede zwischen Mediumkontrolle und Testansatz feststellbar (Fig. 2). Um unspezifische cytotoxische Effekte ausschließen zu können, wurde diese Verdünnung daher als Maximaldosis für die Testserien auf MCF-7 Zellen eingesetzt.

Figur 3 verdeutlicht im Vergleich die Proliferation für das Kontrollsystem, für eine  $10^{-5}$  molare Tamoxifen-Lösung, ein  $10^{-8}$  molare Östradiollösung sowie für eine Kombination von Tamoxifen und Östradiol, um auch die durch Tamoxifen verursachte Hemmung von östrogeninduzierten Proliferationen zu verifizieren.

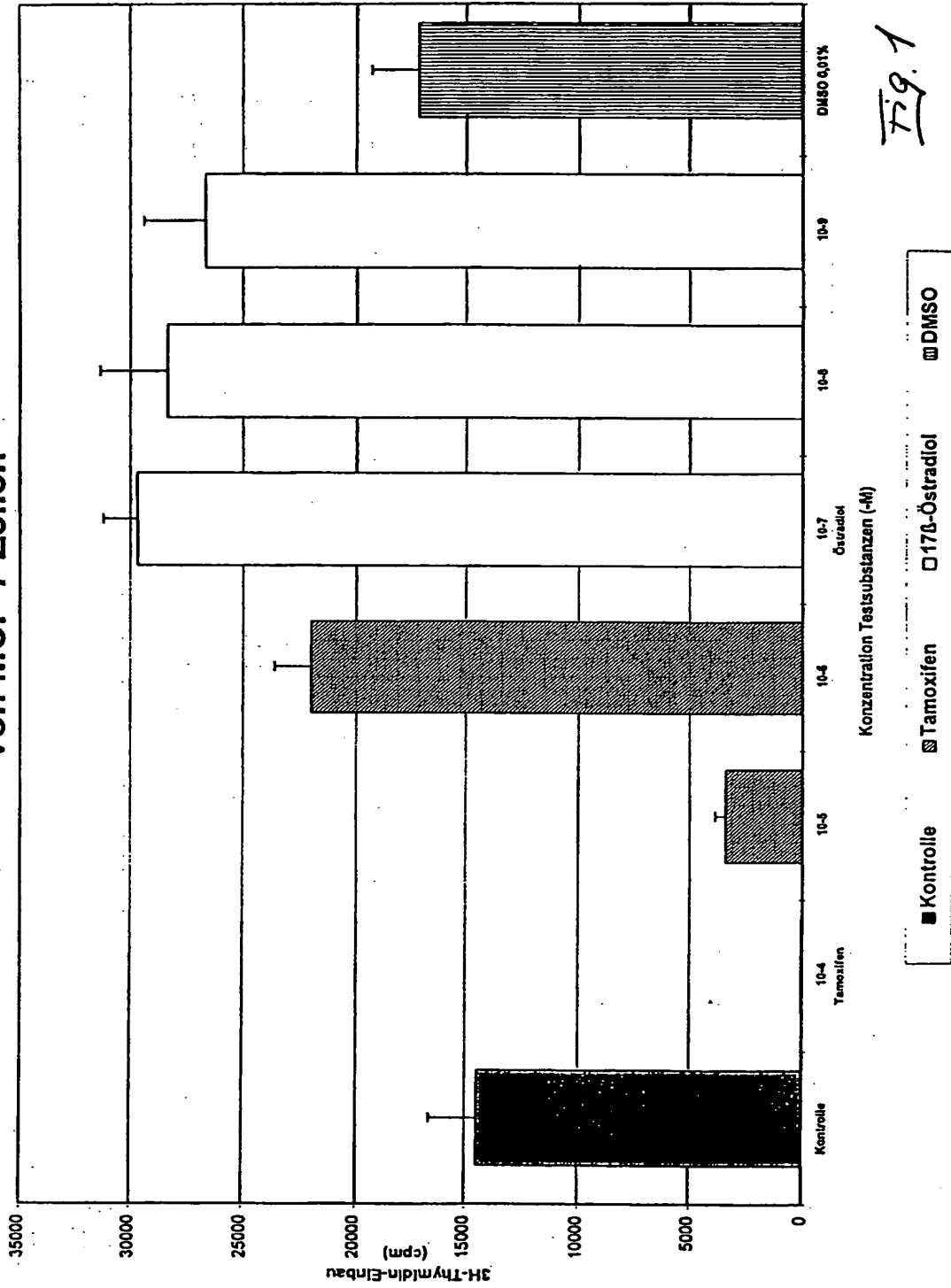
Figur 3 zeigt ferner die Proliferationshemmung für Kombinationen von  $10^{-5}$  molarem Tamoxifen mit Extrakt von *Cimicifuga racemosa* in verschiedenen 1:10-Verdünnungen zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-8}$ . Es zeigt sich, daß in den Verdünnungen  $10^{-3}$  bis  $10^{-5}$  die proliferationshemmende Wirkung von Tamoxifen deutlich verstärkt wird, wobei in der Verdünnung  $10^{-3}$  die Proliferation vollständig und in der Verdünnung  $10^{-4}$  fast vollständig unterdrückt wird. In Verdünnungen von  $10^{-6}$  und höher wird die proliferationshemmende Wirkung von Tamoxifen nicht verstärkt.

Durch die Kombination von Tamoxifen mit dem *Cimicifuga*-Extrakt in einer Verdünnung von  $10^{-3}$  oder  $10^{-4}$  läßt sich daher eine nahezu vollständige Proliferationshemmung der Tumorzellen erreichen, ohne hierfür höhere Tamoxifen-Konzentrationen, beispielsweise  $10^{-4}$ -Molar einsetzen zu müssen, die bereits toxische Effekte zeigen.

#### Patentansprüche

1. Verwendung eines Extraktes aus *Cimicifuga racemosa* zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung östrogenabhängiger Tumore in Kombination mit einem antiöstrogenen Wirkstoff enthaltenden Arzneimittel.
2. Verwendung eines Extraktes aus *Cimicifuga racemosa* in Kombination mit einem antiöstrogenen Wirkstoff zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung östrogenabhängiger Tumore.
3. Verwendung eines Extraktes nach Anspruch 1 oder 2 in Kombination mit Tamoxifen.
4. Verwendung eines Extraktes nach Anspruch 1 oder 2 in Kombination mit Genistein.
5. Verwendung eines Extraktes aus *Cimicifuga racemosa* nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in einer Dosierung zwischen etwa 5 mg und etwa 500 mg Droge pro Tag.

# Einfluß von Östradiol und Tamoxifen auf die Proliferation von MCF-7 Zellen



# Toxizitätsbestimmung

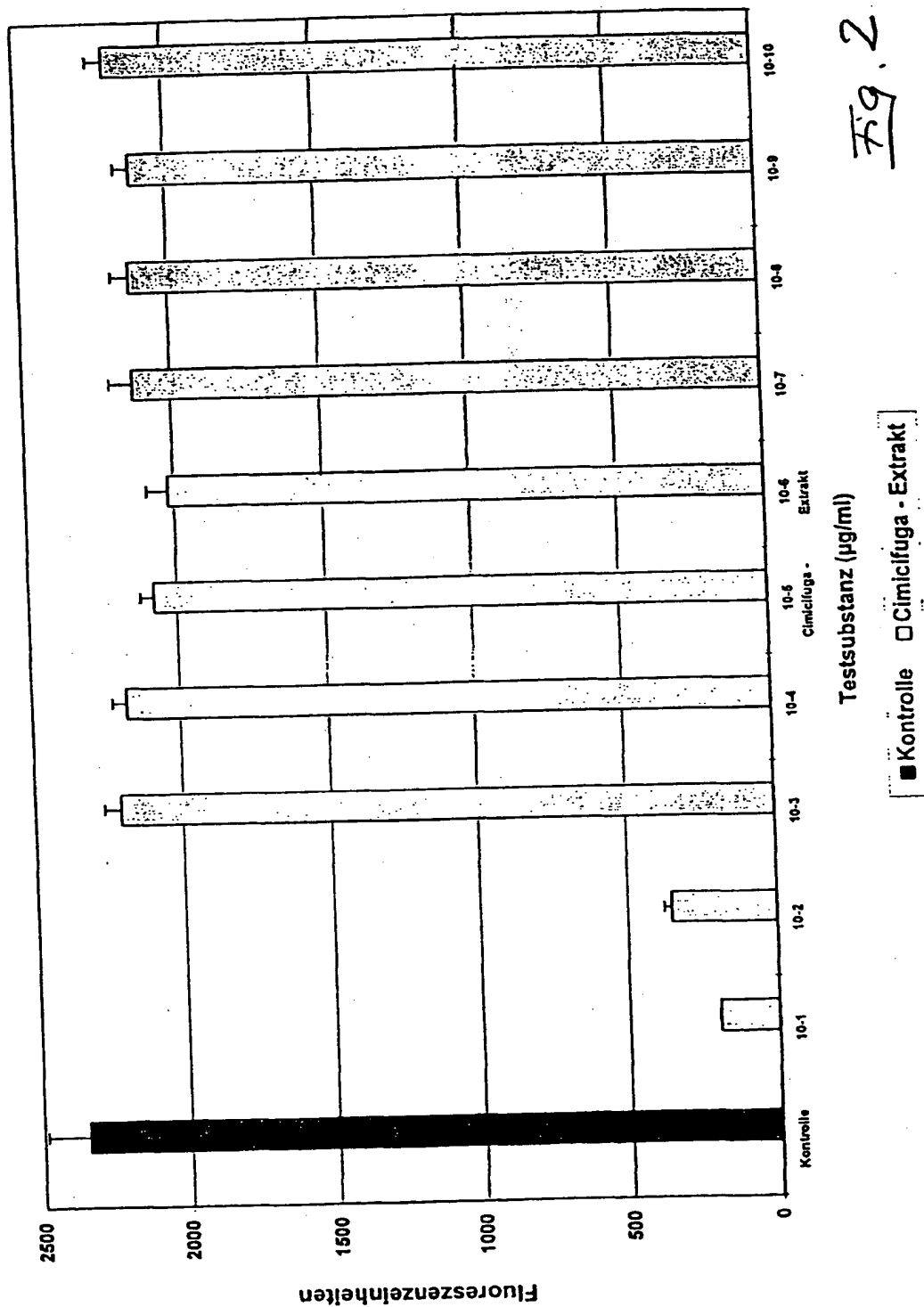
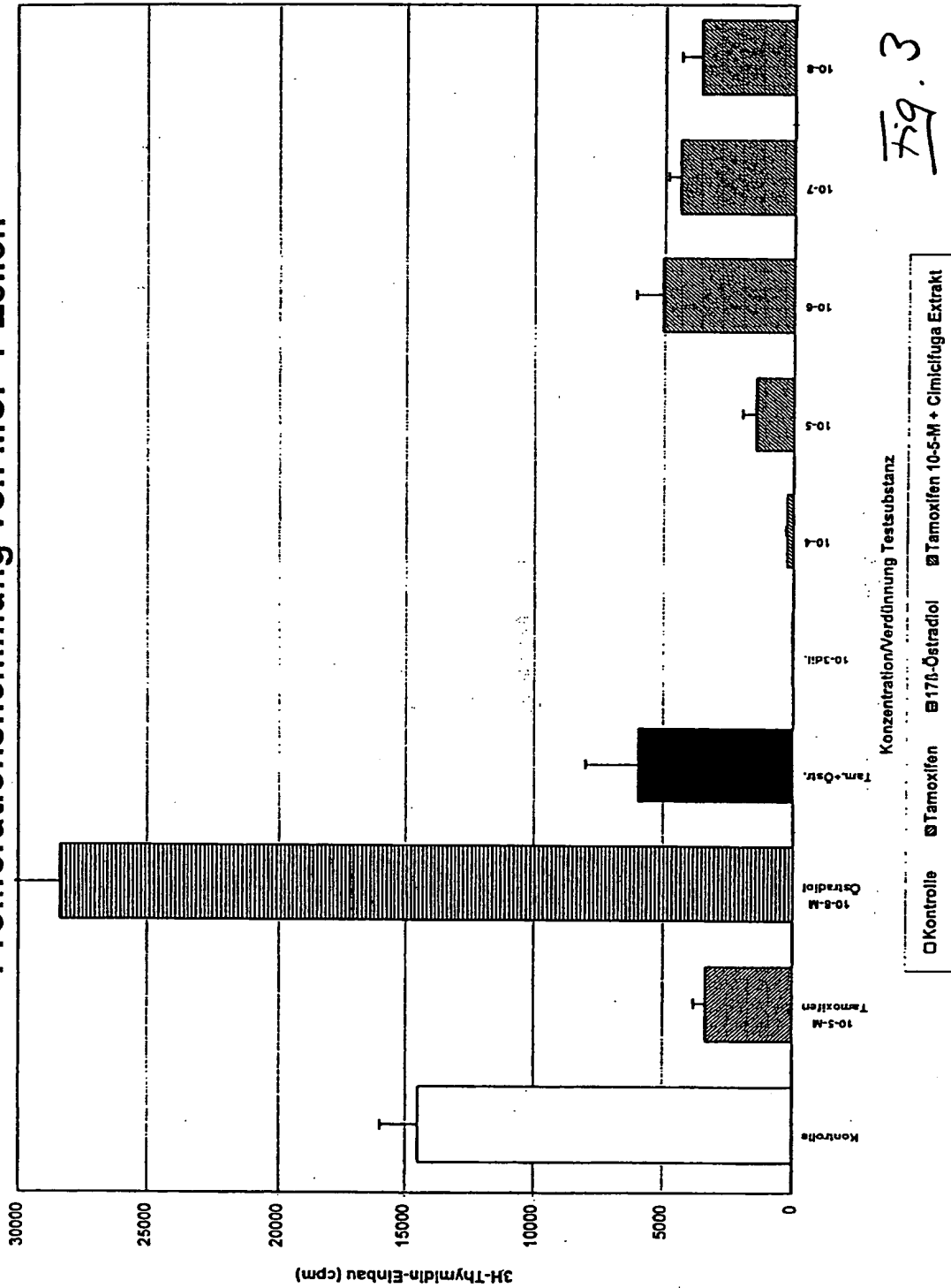


Fig. 2



3.  
179



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 97 12 1030

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 015, no. 001 (C-0793), 7. Januar 1991 & JP 02 255622 A (TSUMURA & CO), 16. Oktober 1990, * Zusammenfassung *	1	A61K35/78
X	T. NESSELHUT ET AL.: "UNTERSUCHUNGEN ZUR PROLIFERATIVEN POTENZ VON PHYTOPHARMAKA MIT ÖSTROGENÄHNLICHER WIRKUNG BEI MAMMAKARZINOMZELLEN." ARCHIVES OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS, Bd. 254, Nr. 1-4, 1993, Seiten 817-818, XP002060552 * das ganze Dokument *	1	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
			A61K
Recherchenort <b>DEN HAAG</b>		Abschlußdatum der Recherche <b>6. April 1998</b>	Prüfer <b>Rempp, G</b>
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03.82 (P04C03)